

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/027303 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 13/12, 13/04 (74) 代理人: 東海 裕作, 外(TOKAI,Yusaku et al.); 〒100-8165 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 日本曹達株式会社内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09549
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 18 日 (18.09.2002) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-284397 2001 年 9 月 19 日 (19.09.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本曹達株式会社 (NIPPON SODA CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒100-8165 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 洋一 (KOBAYASHI,Yoichi) [JP/JP]; 〒250-0280 神奈川県小田原市高田 3 4 5 日本曹達株式会社 小田原研究所内 Kanagawa (JP). 水井 良典 (MIZUI,Ryousuke) [JP/JP]; 〒250-0280 神奈川県小田原市高田 3 4 5 日本曹達株式会社 小田原研究所内 Kanagawa (JP). 早川 公一 (HAYAKAWA,Koichi) [JP/JP]; 〒250-0280 神奈川県小田原市高田 3 4 5 日本曹達株式会社 小田原研究所内 Kanagawa (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING 2-AMINO ACID

(54) 発明の名称: 2-アミノ酸の製造方法

(57) Abstract: A process for producing a 2-amino acid represented by the general formula [II]:  $RCH(NH_2)COOH$  (wherein R represents hydrogen, optionally substituted  $C_{1-6}$  alkyl, optionally substituted  $C_{2-6}$  alkenyl, etc.), characterized by hydrolyzing a 2-aminonitrile represented by the general formula [I]:  $RCH(NH_2)CN$  (wherein R has the same meaning as defined above) in an aqueous amine solution with the aid of a biocatalyst having nitrile hydrolysis activity to thereby convert it into the 2-amino acid represented by the general formula [II].

(57) 要約:

本発明は一般式(I):  $RCH(NH_2)CN$  (式中、Rは水素原子、置換基を有しても良い  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基、置換基を有しても良い  $C_2 \sim C_6$  のアルケニル基等を示す。) で表わされる 2-アミノニトリルをアミンを含む水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して一般式(II):  $RCH(NH_2)COOH$  (式中、Rは前記と同一の意味を表わす。) で表わされる 2-アミノ酸に変換することを特徴とする一般式 [II] で表わされる 2-アミノ酸の製造方法である。

WO 03/027303 A1

## 明細書

## 2-アミノ酸の製造方法

## 技術分野

- 5 本発明は2-アミノニトリルを原料としてアミンの存在下で生体触媒の作用により2-アミノ酸を製造する方法に関する。本発明により製造される2-アミノ酸は、農医薬用・食品用・飼料添加用などの用途があり広汎に利用される。

## 背景技術

- 10 生体触媒のニトリル加水分解活性を用いた2-アミノ酸の製造方法としては、2-アミノニトリルを原料とする方法（特公昭58-15120号公報、特表昭63-500004号公報、特開平2-31694号公報、特表平3-500484号公報、特公平3-16118号公報）およびシアンヒドリンを原料とする方法（特開平9-140391号公報）が知られている。
- 15 2-アミノニトリルを原料とする場合は、2-アミノニトリルが水溶液中においてpH9以下ではアンモニアが遊離してシアンヒドリンに変化する性質があり、またpH9を超えるアルカリ域では水和して不可逆的にアミドに変化する性質がある（アナリスト、11月号、1984年、第109巻、1439～1442頁（ANALYST, NOVEMBER, 1984, VOL. 109, pp1439～1442））ため、それらの生成を抑えて収率良く2-アミノ酸を得るためには
- 20 極めて活性の高い生体触媒を用いることが必要である。ところが既存の生体触媒では触媒活性が十分ではない上に副生したシアンヒドリンをさらに2-ヒドロキシ酸に不可逆的に変換するため、高収率で2-アミノ酸を得ることは困難であった。一方シアンヒドリンを原料として用いる方法では、アンモニアまたはアンモニウム塩の存在下でシアンヒドリンに生体触媒を作用させることにより収率は改善されることが知られて
- 25 ていた（特開平9-140391号公報）ものの生産速度が遅く、アンモニウム塩の添加は実用的でないとされていた。

## 発明の開示

- 本発明は、2-アミノニトリルを直接の原料として、生体触媒を用いて効率よく2-アミノ酸を製造する方法を提供することを目的とする。

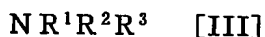
本発明者らは生体触媒の2-アミノニトリルに対する加水分解活性を改善する添加剤のスクリーニングの過程で、アミンが生体触媒の加水分解活性を著しく促進する効果を有することを見出した。次いで、アミンの適用pHについて検討したところ、弱酸性～アルカリ性に及ぶ広いpH領域で活性促進作用を有するのみならず、意外にも

pH9 以下ではシアンヒドリンからの 2-ヒドロキシ酸の生成抑制効果を有し、また pH9 を超えるアルカリ領域ではアミドの生成抑制効果を有することを見出した。

本発明は、2-アミノニトリルを直接の原料として生体触媒の作用により 2-アミノ酸を製造する際に、アミンを共存させることにより、副生成物の生成を抑制しつつ極めて高い生産速度で目的の 2-アミノ酸を得ることができるという上記知見に基づいて完成に至ったものである。

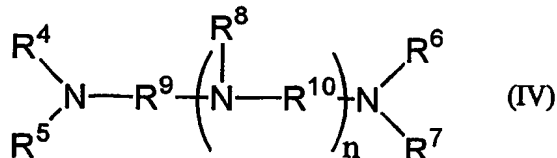
すなわち本発明は、一般式(I) :  $RCH(NH_2)CN$  (式中、R は水素原子、置換基を有しても良い  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基、置換基を有しても良い  $C_2 \sim C_6$  のアルケニル基、置換基を有しても良い  $C_1 \sim C_6$  のアルコキシル基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を有しても良いアリールオキシ基または置換基を有しても良い複素環基を示し、R が置換基を有しても良い  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基の場合、アミノ基と R が結合して環を形成してもよい。) で表わされる 2-アミノニトリルをアミンを含む水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して一般式(II) :  $RCH(NH_2)COOH$  (式中、R は前記と同一の意味を表わす。) で表わされる 2-アミノ酸に変換することを特徴とする一般式 [II] で表わされる 2-アミノ酸の製造方法 (請求の範囲 1)、または

アミンが、一般式 [III]



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  はそれぞれ独立して、水素原子、(置換基を有していてもよい) 環状もしくは直鎖もしくは分岐の  $C_1 \sim C_8$  のアルキル基、(置換基を有していてもよい) 環状もしくは直鎖もしくは分岐の  $C_2 \sim C_8$  のアルケニル基、置換基を有していてもよいフェニル基、置換基を有していてもよいピリジル基であり、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  のうち任意の 2 つが結合して 5 から 8 員環の環状アミンを形成してもよい。ただし、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  に同時に水素が置換した化合物は除く。) で表わされるモノアミンであることを特徴とする請求の範囲 1 記載の一般式 [II] で表される 2-アミノ酸の製造方法 (請求の範囲 2)、または

アミンが一般式 [IV]



(式中、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$  は、それぞれ独立して、水素原子、(置換基を有していてもよい) 環状もしくは直鎖もしくは分岐の炭素数  $C_1 \sim C_8$  のアルキル基、(置換基を有していてもよい) 環状もしくは直鎖もしくは分岐の炭素数  $C_2 \sim C_8$  のアルケニル基、置換基を有していてもよいフェニル基、置換基を有していてもよいピリジル基

を表わし、

$R^9$ 、 $R^{10}$  は置換基を有していてもよい炭素数  $C_1 \sim C_{10}$  のアルキレン基、置換基を有していてもよいフェニレン基を表わし、

$n$  は 0 または 1 ～ 8 の整数を表わし、

- 5  $n$  が 2 ～ 8 のときは、 $R^8$ 、 $R^{10}$  はそれぞれ複数個存在するが、これらは各々異なっているてもよい。また、 $R^4$  もしくは  $R^5$  と  $R^6$  もしくは  $R^7$  が結合して 5 から 8 員環の環状ポリアミンを形成してもよい。) で表わされるポリアミンであることを特徴とする請求の範囲 1 記載の一般式 [II] で表される 2-アミノ酸の製造方法 (請求の範囲 3) である。

- 10 以下本発明を詳細に説明する。

- 本発明の一般式 [II] :  $RCH(NH_2)COOH$  (式中、 $R$  は水素原子、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基、置換基を有してもよい  $C_2 \sim C_6$  のアルケニル基、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルコキシル基、置換基を有してもよいアリール基、置換基を有してもよいアリールオキシ基または置換基を有してもよい複素環基を示す。) で表わされる 2-アミノ酸の製造方法としては、一般式 [I] :  $RCH(NH_2)CN$  (式中、 $R$  は水素原子、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基、置換基を有してもよい  $C_2 \sim C_6$  のアルケニル基、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルコキシル基、置換基を有してもよいアリール基、置換基を有してもよいアリールオキシ基または置換基を有してもよい複素環基を示す。) で表わされる 2-アミノニトリルを、アミンを含む水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して一般式 [II] で表わされる 2-アミノ酸に変換する製造方法であれば特に制限されるものではない。

- 本発明で使用される生体触媒としては、水溶液中でニトリルを加水分解する活性を有する微生物等の生体の触媒であれば特に制限されるものではなく、かかる生体としては例えばアースロバクター (*Arthrobacter*) 属、バリオボラクス (*Variovorax*) 属に属する微生物が挙げることができ、これらの中でも特に、アースロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) NSSC 104 (FERM BP-5829)、アースロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) NSSC 204 (FERM BP-7662) およびバリオボラクス パラドキサス (*Variovorax paradoxus*) IAM 12374 を好適に例示することができる。

アースロバクター NSSC 104 (FERM BP-5829) は独立行政法人産業技術総合研究所に 1996 年 2 月 6 日付で寄託されており、その菌学的性質については WO 97/32030 に記載されている。

またアースロバクター NSSC 204 (FERM BP-7662) は同じく独立

行政法人産業技術総合研究所に2000年6月22日付で寄託されており、その菌学的性質についてはPCT/JPO1/06291に記載されている。

また、バリオボラクス パラドキサス (*Variovorax paradoxus*) IAM12374 は東京大学分子細胞生物研究所より容易に入手でき、その菌学的性質についてはインターナショナル ジャーナル オブ システマチック バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology) 第41巻、445~450ページ(1991年)に記載されている。

これらの微生物の培養は、酵素誘導物質、微生物が資化する炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要ならば有機栄養源を含む通常の培地で行われる。酵素誘導物質としては、イソブチロニトリル、2-アミノベンゾニトリル等のニトリル化合物、 $\epsilon$ -カプロラクタムなどの環状アミド化合物等が使用され、特に2-アミノベンゾニトリルが好ましい。炭素源としてはグルコース等の炭水化物、エタノール等のアルコール類、有機酸その他が適宜用いられる。窒素源としては、アミノ酸、硝酸塩、アンモニウム塩その他が用いられる。無機イオンとしては、リン酸イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、硫酸イオン、鉄イオン、その他が必要に応じて使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸など及びこれらを含むコーンスチープリカー、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、その他が適宜用いられる。培養は好気的条件下に、pH6~9、温度25~37℃の適当な範囲に制御しつつ行えばよい。

本発明に用いられる生体触媒としては、上記のように培養した菌体その他、その菌体から調製した固定化菌体、粗酵素もしくは固定化酵素などの菌体処理物が挙げられる。菌体又は酵素を固定化する場合は担体結合法、包括法等の通常行われる固定化技術を適用できる。酵素または粗酵素を調製する場合は、菌体を超音波、高圧ホモジナイザー等によって破碎した後に、硫酸塩析、クロマトグラフィー等の通常行われる酵素精製技術が適用できる。また反応に用いた菌体等の生体触媒は実質的な活性低下なしに繰り返し加水分解反応に使用することができる。

本発明で用いられる一般式(I)において、Rは水素原子、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基、置換基を有しても良い $C_2 \sim C_6$ のアルケニル基、置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルコキシ基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を有しても良いアリールオキシ基または置換基を有しても良い複素環基を表わし、該置換基としては、ヒドロキシ基、メルカプト基、アミノ基、置換基を有していてもよいフェニル基、イミダゾール基、インドール基、 $C_1 \sim C_6$ アルキルチオ基等を挙げることができる。

置換基を有しても良い $C_1 \sim C_6$ のアルキル基としては、 $C_1 \sim C_6$ のアルキルチオアルキル基又は $C_1 \sim C_6$ のヒドロキシアルキル基を、置換基を有しても良いアリール基

としてはフェニル基を好適に例示することができる。

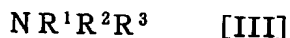
一般式(I) で表わされる2-アミノニトリルとしては、公知の2-アミノ酸に対応するニトリル化合物であれば特に制限なく使用できる。

具体的には、2-アミノ-アセトニトリル、2-アミノ-プロピオニトリル、2-アミノ-イソバレロニトリル、2-アミノ-3-ヒドロキシプロピオニトリル、2-アミノ-3-メチルバレロニトリル、2-アミノ-4-メチルバレロニトリル、2-アミノ-3-ヒドロキシブチロニトリル、2-アミノ-3-メルカプトプロピオニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノフェニルアセトニトリル、2-アミノ-3-フェニルプロピオニトリル、2-ピロリジンカルボニトリル等を挙げることができる。例えば2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを用いると、有用なアミノ酸であるメチオニンを得ることができる。

これらの2-アミノニトリルは0.01~50重量%の濃度で反応に使用され、必要ならば反応の間、逐次添加あるいは連続添加することができる。

本発明で用いられるアミンは、モノアミン、ポリアミンのいずれでもよい。

モノアミンとしては一般式 [III]



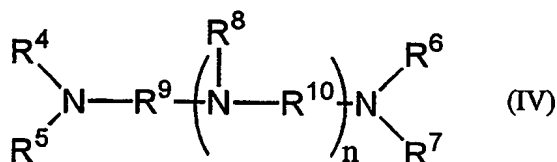
で表わされるアミンを挙げることができ、

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>としては具体的に、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、t-ブチル基、s-ブチル基、イソブチル基、n-ペンチル基、s-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、n-ヘキシル基、s-ヘキシル基、1,1-ジメチル-n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、1-メチルシクロペンチル基、1-メチルシクロヘキシル基等の環状または直鎖または分岐のC<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>のアルキル基、ビニル基、アリル基、2-ブテニル基、1-メチル-2-プロペニル基、4-オクテニル基等の環状または直鎖または分岐のC<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>のアルケニル基、フェニル基、ピリジル基等を挙げることができる。

また第二アミン、第三アミンの場合は、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>のうち任意の2つの炭化水素基が結合して5から8員環の環状アミンを形成してもよい。

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>は更に置換基を有していてもよく、該置換基としてはメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i-プロポキシ基、ブトキシ基等のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>のアルコキシ基、メチルチオ基、エチルチオ基、n-プロピルチオ基、i-プロピルチオ基、ブチルチオ基等のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>のアルキルチオ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、フェニル基等を挙げることが出来る。

ポリアミンとしては、一般式 [IV]



を挙げることができ、

- $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ としては、具体的に、水素原子、メチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、イソプロピル基、 $n$ -ブチル基、 $t$ -ブチル基、 $s$ -ブチル基、イソブチル基、 $n$ -ペンチル基、 $s$ -ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、 $n$ -ヘキシル基、 $s$ -ヘキシル基、1, 1-ジメチル- $n$ -ヘキシル基、 $n$ -ヘプチル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、1-メチルシクロペンチル基、1-メチルシクロヘキシル基等の環状または直鎖または分岐の $C_1 \sim C_8$ のアルキル基、ビニル基、アリル基、2-ブテニル基、1-メチル-2-プロペニル基、4-オクテニル基等の環状または直鎖または分岐の $C_2 \sim C_8$ のアルケニル基、フェニル基、ピリジル基を挙げることができる。

$R^9$ としてはメチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基等の炭素数 $C_1 \sim C_{10}$ のアルキレン基、フェニレン基を挙げることができる。

- $n$ は0または1～8の整数を表わし、

$n$ が2～8のときは、 $R^8$ 、 $R^{10}$ はそれぞれ複数存在することになるが、これらは各々異なってもよい。

また、 $R^4$ もしくは $R^5$ と、 $R^6$ もしくは $R^7$ が、結合して5から8員環の環状ポリアミンを形成してもよい。

- $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ は更に置換基を有していてもよく、該置換基としてはヒドロキシル基、カルボキシル基、メチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、イソプロピル基、 $n$ -ブチル基等のアルキル基を挙げることが出来る。

- モノアミンの具体例としては、2-アミノエタノール、2-アミノ-1-プロパノール、3-アミノ-1-プロパノール、1-アミノ-2-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、3-アミノ-1-ブタノール、3-アミノ-2-ブタノール、4-アミノ-1-ブタノール、2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、セリン、ホモセリン、スレオニン等を挙げることができる。

- ポリアミンの具体例としては、エチレンジアミン、1,2-ジアミノプロパン、1,2-ジアミノ-2-メチルプロパン、1,3-ジアミノプロパン、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン、プトレスシン、カダベリン、1,2-ジアミノシクロヘキサン、ジエチレントリ

アミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、ペンタエチレンヘキサミン、N-メチルエチレンジアミン、N,N-ジメチルエチレンジアミン、N,N'-ジメチルエチレンジアミン、N,N,N'-トリメチルエチレンジアミン、3-(メチルアミノ)プロピルアミン、ピペラジン、スベルミジン、スベルミン、リジン、オルニチン等を挙げることができる。

これらのアミンのうち、比較的安価で生体触媒の活性促進効果が高い点で、2-アミノエタノール、3-アミノ-1-プロパノール、スレオニン、エチレンジアミン、1,2-ジアミノプロパン、1,3-ジアミノプロパン、ジエチレントリアミン、3-(メチルアミノ)プロピルアミン、リジン又はそれらの混合物が好ましい。

これらのアミンは、塩酸等の強酸又は酢酸等の弱酸と組み合わせて緩衝液成分として用いることができる。また2種類以上を組み合わせても使用できる。

また、これらのアミンは0.1 mMから飽和濃度の範囲で使用できるが、2 mM~1 000 mMで使用することが2-アミノ酸の変換効率の点で好ましい。

本発明で使用される水溶液としては上記のアミンを含むものであれば、他に無機塩、有機酸塩、有機塩基または有機溶媒を含んでいても良く、あるいは水と2相に分離しても良い。

本発明に用いられる生体触媒による加水分解反応は、アミンを含む水性溶媒中で上記の生体触媒を一般式 [I] で表わされる2-アミノニトリルに作用させることによって行われる。生体触媒は乾燥重量に換算して、通常0.001~10重量%の濃度で使用され、反応終了後は濾過、遠心分離又は限外濾過膜濃縮法によって回収して繰り返し加水分解反応に使用することもできる。また、加水分解反応における反応pHは、特に限定されるものではないが、適当な緩衝剤または酸もしくはアルカリによって5~12の間に保てばよい。反応の温度は4~80℃、好ましくは20~60℃に保てばよい。かかる加水分解反応により、用いた2-アミノニトリルに対応する2-アミノ酸が反応液中に生成される。

一般式 [II] で表わされる2-アミノ酸としては、例えば、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン、バリン、トリプトファン、チロシン、ノルロイシン、フェニルグリシンなどが挙げられる。これら2-アミノ酸は生体触媒の光学選択性によってD型、L型あるいはラセミ体のアミノ酸として得られる。生成された2-アミノ酸は、濾過、濃縮、抽出、イオン交換樹脂などの常法によって分離精製することができる。



発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げて詳細に述べる。

**実施例 1** (NSSC104株による DL-メチオニンの製造)

5 (NSSC104株の培養)

酵母エキス0.5%、グルコース0.5%、リン酸水素二カリウム0.1%、リン酸二水素カリウム0.1%、食塩0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.02%、硫酸第一鉄0.001%及びε-カプロラクタム0.5%を含む培地2mlを試験管にとり121℃で20分間滅菌した。下記の組成の培地20mlを100ml容量のバ

- 10 ッフル付き三角フラスコに入れた。アースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC104株を前記の試験管に一白金耳植菌し、33℃で一晩振盪培養した後、その0.2mlを前記のバッドフル付き三角フラスコに植え継ぎ、さらに4日間33℃で振盪培養した。
- |              |      |               |
|--------------|------|---------------|
| コーンステープリカー   | 2.0% | (濾過滅菌)        |
| スクロース        | 1.0% | (121℃で20分間滅菌) |
| 15 ε-カプロラクタム | 0.5% | (121℃で20分間滅菌) |
| pH           | 7.2  | (2N苛性ソーダで調整)  |

(DL-メチオニンの生成)

- 得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC104株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体濃度で0.4%(W/W)となるように133m
- 20 Mの2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと150mMエチレンジアミンを含む水溶液(pH11.3)に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加4時間後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー(カラム:TSKgel ODS-80TM 東ソー製、キャリア:エタノール/水/トリフルオロ酢酸=5/95/0.04)を用いて
- 25 定量した結果、125mMのDL-メチオニンの蓄積を確認した。

**実施例 2** (NSSC204株による DL-メチオニンの製造)

(NSSC204株の培養)

- 酵母エキス0.5%、グルコース0.5%、リン酸水素二カリウム0.1%、リン酸二水素カリウム0.1%、食塩0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.02%、硫酸第一鉄0.001%及び2-アミノベンゾニトリル0.03%を含む培地2mlを試験管にとり121℃で20分間滅菌した。下記の組成の培地20mlを100ml容量のバッドフル付き三角フラスコに入れた。アースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC204株を前記の試験管に一白金耳植菌し、33℃で一晩振盪培養した後、その0.

2 ml を前記のバッフル付き三角フラスコに植え継ぎ、さらに 4 日間 33℃で振盪培養した。

コーンスチープリカー	2.0%	(濾過滅菌)
スクロース	1.0%	(121℃で20分間滅菌)
5 2-アミノベンゾニトリル	0.03%	(121℃で20分間滅菌)
pH	7.2	(2N苛性ソーダで調整)

(DL-メチオニンの生成)

得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC 204 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体濃度で 0.1%(W/W)となるように 133mM の 2-アミノ-4-メチルチオプロニトリルと 25mM 1, 3-ジアミノプロパンを含む水溶液 (pH11.2) に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 4 時間後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80 TM 東ソー製、キャリア: エタノール/水/トリフルオロ酢酸=5/95/0.04) を用いて定量した結果、125mM の DL-メチオニンの蓄積を確認した。

### 実施例 3 (IAM12374 株による DL-メチオニンの製造)

(IAM12374 株の培養)

0.3% 肉汁、0.5% ペプトン及び 0.5% 食塩を含む培地 2 ml を試験管に、  
20 下記の組成の培地 20 ml を 100 ml 容量のバッフル付き三角フラスコに入れ、  
各々 121℃で15分間滅菌した。バリオボラクス パラドキサス (*Variovorax paradoxus*) IAM12374 株を前記の試験管に一白金耳植菌し、30℃で一晩振盪培養した後、その 0.2 ml を前記のバッフル付き三角フラスコに植え継ぎ、さらに 5 日間 30℃で振盪培養した。

25 酵母エキス	0.5%
グリセロール	0.5%
リン酸一カリウム	0.1%
リン酸二カリウム	0.1%
食塩	0.02%
30 硫酸マグネシウム 7 水塩	0.02%
$\epsilon$ -カプロラクタム	0.5%
pH	7.2 (2N 苛性ソーダで調整)

(DL-メチオニンの生成) 得られたバリオボラクス パラドキサス (*Variovorax paradoxus*) IAM12374 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、

- 乾燥菌体濃度で2%(W/W)となるように133mMの2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと125mM 3-アミノ-1-プロパノールを含む水溶液(pH11.7)に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加10時間後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー(カラム:TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア:エタノール/水/トリフルオロ酢酸=5/95/0.04)を用いて定量した結果、120mMのDL-メチオニンの蓄積を確認した。

#### 実施例4 (エチレンジアミンとDL-メチオニンの生成速度の関係)

- 10 実施例2によって得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC 204株の培養液を遠心分離し、乾燥菌体濃度で0.1%(W/W)となるように133mMの2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと第1表に示した濃度のエチレンジアミンを含む0.2M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$  緩衝液(pH11)に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加30分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれる
- 15 メチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー(カラム:TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア:10mMリン酸二水素カリウム-15mMリン酸-3mMヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0Mアセトニトリル水溶液)を用いて定量し、乾燥菌体1g当たりのDL-メチオニン生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )並びにDL-メチオニンアミド生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )を計算した。結果を第1表に示す。第1表から
- 20 10mM~250mMのエチレンジアミンの添加によりDL-メチオニンの生成速度が著しく向上すると共にDL-メチオニンアミドの副生速度が低下することがわかる。

第1表

エチレンジアミン濃度 (mM)	DL-メチオニン 生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )	DL-メチオニンアミド 生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )
0	62	272
10	348	62
25	592	58
50	784	45
100	840	45
150	991	58
200	938	55
250	875	64

**実施例 5** (1,3-ジアミノプロパン濃度と DL-メチオニンの生成速度の関係)

実施例 2 によって得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC 204 株の培養液を遠心分離し、乾燥菌体濃度で 0.1%(W/W)となるように 133mM の 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと第 2 表に示した濃度の 1,3-ジアミノプロパンを含む 0.2M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$  緩衝液 (pH11) に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニン及びメチオニンアミドの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア: 10mM リン酸二水素カリウム-15mM リン酸-3mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0M アセトニトリル水溶液) を用いて定量し、乾燥菌体 1g 当たりの DL-メチオニン生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ ) 並びに DL-メチオニンアミド生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ ) を計算した。結果を第 2 表に示す。第 2 表から 2mM~100mM の 1,3-ジアミノプロパンの添加により DL-メチオニンの生成速度が著しく向上すると共に DL-メチオニンアミドの副生速度が低下することがわかる。

第 2 表

1,3-ジアミノプロパン濃度 (mM)	DL-メチオニン生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )	DL-メチオニンアミド生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )
0	62	272
2	212	52
5	488	39
10	751	32
25	910	53
50	884	36
75	838	37
100	525	39

**実施例 6** (3-アミノ-1-プロパノール濃度と DL-メチオニンの生成速度の関係)

実施例 1 によって得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC 104 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体濃度で 0.3%(W/W)となるように 133mM の 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと第 3 表に示した濃度の 3-アミノ-1-プロパノールを含む 0.2M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$  緩衝液 (pH11) に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して

菌体を除去し、残った反応液に含まれる DL-メチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー（カラム：TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア：10 mMリン酸二水素カリウム-15 mMリン酸-3 mMヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0Mアセトニトリル水溶液）を用いて定量し、乾燥菌体1 g当たりの DL-メチオニンの生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ ) 並びに DL-メチオニンアミド生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )を計算した。結果を第3表に示す。第3表から 25mM~200mM の 3-アミノ-1-プロパノールの添加により DL-メチオニンの生成速度が著しく向上すると共に DL-メチオニンアミドの副生速度が低下することがわかる。

第3表

3-アミノ-1-プロパノール (mM)	DL-メチオニン 生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )	DL-メチオニンアミド 生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )
0	31	272
25	268	61
50	349	71
75	369	77
100	367	64
125	366	57
150	354	79
200	310	93

#### 実施例7 (DL-メチオニンの生成速度と反応pHの関係)

実施例2によって得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC204株の培養液を遠心分離し、乾燥菌体濃度で 0.1%(W/W)となるように 133mMの2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと第4-1表に示した pH の 0.15M エチレンジアミン-塩酸を含む緩衝液に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニン、2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸及びメチオニンアミドの濃度を高速液体クロマトグラフィー（カラム：TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア：10 mMリン酸二水素カリウム-15 mMリン酸-3 mMヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0Mアセトニトリル水溶液）を用いて定量し、乾燥菌体1 g当たりの DL-メチオニン生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )、2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )及び DL-メチオニンアミド生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )を計算した。また対

照として 0.2M リン酸水素二カリウム-リン酸二水素ナトリウム緩衝液及び 0.2M 塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液を用いて同様の実験を行った。結果を第4-1表、第4-2表及び第4-3表に示す。これらの表から、エチレンジアミン-塩酸緩衝液を用いることにより、pH6~11の範囲でDL-メチオニンの生成速度が著しく向上すると共に、pH9を超える領域ではDL-メチオニンアミドの副生速度が著しく低減し、pH9以下では2-ヒドロキシ酸の副生速度が大きく低減することがわかる。

第4-1表 各種緩衝液pHとDL-メチオニン生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )の関係

緩衝液 \ pH	6	7	8	9	10	11
0.15M エチレンジアミン-塩酸緩衝液	730	1010	1050	418	635	860
0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液	227	286	290	—	—	—
0.2M $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液	—	—	—	183	93	62

10 第4-2表 各種緩衝液pHとDL-メチオニンアミド生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )の関係

緩衝液 \ pH	6	7	8	9	10	11
0.15M エチレンジアミン-塩酸緩衝液	26	25	36	34	36	44
0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液	17	22	29	—	—	—
0.2M $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液	—	—	—	19	91	272

第4-3表 各種緩衝液pHと2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )の関係

緩衝液 \ pH	6	7	8	9	10	11
0.15M エチレンジアミン-塩酸緩衝液	25	18	29	13	18	6.5
0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液	32	69	73	—	—	—
0.2M $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液	—	—	—	37	13	4.0

15 実施例8 (各種アミンの添加濃度とDL-メチオニンの生成速度の関係)

実施例2によって得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC 204株の培養液を遠心分離し、乾燥菌体濃度で0.1%(W/W)となるように133mMの2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと第5表に示した濃度のアミンを含む水溶液に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加30分後に遠心

分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニン及びメチオニンアミドの濃度を高速液体クロマトグラフィー（カラム：TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア：10mMリン酸二水素カリウム-15mMリン酸-3mMヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0Mアセトニトリル水溶液）を用いて定量し、乾燥菌体 5 1g当たりの DL-メチオニン生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )並びに DL-メチオニンアミド生成速度( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )を計算した。なお対照実験としてアミン非添加の場合は、pHを揃えるために 0.1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$  緩衝液(pH10 又は pH11)を添加した。結果を第5表に示す。第5表に示したアミンを添加することにより、DL-メチオニンの生成速度が著しく向上すると共に、DL-メチオニンアミドの副生速度が低減することがわかる。

第5表

添加物	PH	添加濃度 (mM)	DL-メチオニン 生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )	DL-メチオニンアミド 生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )
$\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ (対照実験)	11	100	62	272
$\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ (対照実験)	10	100	93	91
エチレンジアミン	11	100	1250	33
1,3-ジアミノプロ パン	11	50	1260	36
1,2-ジアミノプロ パン	11	100	1280	52
1,2-ジアミノ-2- メチルプロパン	11	100	1240	64
1,3-ジアミノ-2-ヒ ドロキシプロパン	11	100	1210	45
1,2-ジアミノシク ロヘキサン	11	50	944	50
ジエチレントリア ミン	11	100	1280	47
スベルミジン	11	25	837	59
N,N-ジメチルエチ レンジアミン	11	100	612	106
N,N'-ジメチルエチ レンジアミン	11	100	1300	47
N,N,N'-トリメチル エチレンジアミン	11	50	469	134
ピペラジン	11	50	706	76
2-アミノエタノー ル	11	125	840	70
3-アミノ-1-プロパ ノール	11	125	1040	57
DL-1-アミノ-2-ブ ロパノール	11	125	853	51
2-アミノ-1-ブタノ ール	11	125	804	73
2-(ヒドロキシメチ ル)-1,3-プロパン ジオール	10	500	643	13
L-スレオニン ア ンモニウム塩水溶 液	10	250	636	60



**実施例 9** (NSSC204株によるフェニルグリシンの製造)

## (フェニルグリシンの生成)

実施例 2 で得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC204 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体濃度で 0.01%(W/W)となるように 33mM の 2-アミノフェニルアセトニトリルと 150mM のエチレンジアミンを含む水溶液に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 6 時間後に反応液を 2 倍体積のイオン交換水で希釈して生成物を溶解した後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるフェニルグリシンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア: 10 mM リン酸二水素カリウム-15 mM リン酸-3 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0M アセトニトリル水溶液) を用いて定量した結果、31 mM のフェニルグリシンの蓄積を確認した。

**実施例 10** (1, 3-ジアミノプロパンとフェニルグリシンの生成速度の関係)

実施例 2 によって得られたアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC204 株の培養液を遠心分離し、乾燥菌体濃度で 0.002%(W/W)となるように 33mM の 2-アミノフェニルアセトニトリルと第 6 表に示した濃度の 1,3-ジアミノプロパンを含む 0.1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$  緩衝液 (pH11) に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加 30 分後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるフェニルグリシンの濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM 東ソー製、キャリア: 10 mM リン酸二水素カリウム-15 mM リン酸-3 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム-2.0M アセトニトリル水溶液) を用いて定量し、乾燥菌体 1 g 当たりのフェニルグリシン生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ ) を計算した。結果を第 6 表に示す。第 6 表から 2~15mM の 1,3-ジアミノプロパンの添加によりフェニルグリシンの生成速度が著しく向上することがわかる。

第 6 表

1,3-ジアミノプロパン (mM)	フェニルグリシン 生成速度 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gdc}$ )
0	5100
2	8400
5	10800
7.5	11100
10	12500
15	12500
25	2840

## 産業上の利用可能性

- 本発明によれば、2-アミノニトリルを直接の原料としてニトリル加水分解活性を有する生体触媒をアミンの存在下で用いることにより、副生成物の生成を抑制しつつ極めて高い生産速度で効率よく目的の2-アミノ酸を得ることができる。

寄託番号 I P O D F E R M B P - 5 8 2 9

寄託の日付 1 9 9 6 年 2 月 6 日

- 10 寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)

寄託機関のあて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6

寄託番号 I P O D F E R M B P - 7 6 6 2

寄託の日付 2 0 0 0 年 6 月 2 2 日

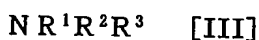
- 15 寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)

寄託機関のあて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6

## 請求の範囲

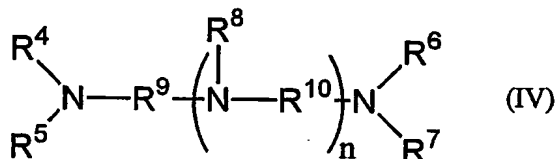
1. 一般式(I) :  $RCH(NH_2)CN$  (式中、Rは水素原子、置換基を有しても良い  
 $C_1 \sim C_6$  のアルキル基、置換基を有しても良い  $C_2 \sim C_6$  のアルケニル基、置換基を有  
 5 しても良い  $C_1 \sim C_6$  のアルコキシル基、置換基を有しても良いアリール基、置換基を  
 有しても良いアリールオキシ基または置換基を有しても良い複素環基を示し、Rが置  
 換基を有しても良い  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基の場合、アミノ基とRが結合して環を形成  
 してもよい。) で表わされる2-アミノニトリルをアミンを含む水溶液中でニトリル  
 加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して一般式(II) :  $RCH(NH_2)COOH$   
 10  $COOH$  (式中、Rは前記と同一の意味を表わす。) で表わされる2-アミノ酸に変換す  
 ことを特徴とする一般式 [II] で表わされる2-アミノ酸の製造方法。

2. アミンが、一般式 [III]



15 [式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  はそれぞれ独立して、水素原子、(置換基を有していてもよい)  
 環状もしくは直鎖もしくは分岐の  $C_1 \sim C_8$  のアルキル基、(置換基を有していてもよ  
 い) 環状もしくは直鎖もしくは分岐の  $C_2 \sim C_8$  のアルケニル基、置換基を有していて  
 もよいフェニル基、置換基を有していてもよいピリジル基であり、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  のう  
 20 ち任意の2つが結合して5から8員環の環状アミンを形成してもよい。ただし、 $R^1$ 、  
 $R^2$ 、 $R^3$  に同時に水素が置換した化合物は除く。] で表わされるモノアミンであること  
 を特徴とする請求の範囲1記載の一般式 [II] で表される2-アミノ酸の製造方法。

3. アミンが一般式 [IV]



25 [式中、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$  は、それぞれ独立して、水素原子、(置換基を有して  
 いてもよい) 環状もしくは直鎖もしくは分岐の炭素数  $C_1 \sim C_8$  のアルキル基、(置換  
 基を有していてもよい) 環状もしくは直鎖もしくは分岐の炭素数  $C_2 \sim C_8$  のアルケニ  
 ル基、置換基を有していてもよいフェニル基、置換基を有していてもよいピリジル基  
 を表わし、

30  $R^9$ 、 $R^{10}$  は置換基を有していてもよい炭素数  $C_1 \sim C_{10}$  のアルキレン基、置換基を有  
 していてもよいフェニレン基を表わし、

- n は 0 または 1 ～ 8 の整数を表わし、  
n が 2 ～ 8 のときは、 $R^8$ 、 $R^{10}$  はそれぞれ複数個存在するが、これらは各々異なってもよい。また、 $R^4$  もしくは  $R^5$  と  $R^6$  もしくは  $R^7$  が結合して 5 から 8 員環の環状ポリアミンを形成してもよい。) で表わされるポリアミンであることを特徴とする請求の範囲 1 記載の一般式 (II) で表される 2-アミノ酸の製造方法。
- 5

PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月18日（18.09.2002）水曜日 16時08分43秒

0-1	様式-PCT/RO/134 (EASY) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-1-1		
0-2	国際出願番号。	PCT/JP02/09549
0-3	出願人又は代理人の書類記号	CASE636
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	17
1-2	行	8
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第 6
1-3-3	寄託の日付	1996年02月06日 (06.02.1996)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-5829
1-4	追加の表示	なし (NONE)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	記載頁	17
2-2	行	13
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
2-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第 6
2-3-3	寄託の日付	2000年06月22日 (22.06.2000)
2-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-7662
2-4	追加の表示	なし (NONE)
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)
受理官庁記入欄		
0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓

2/2

PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月18日（18.09.2002）水曜日 16時08分43秒

0-4-1	権限のある職員	堀野 英子
-------	---------	-------

## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理 された日	01.10.02
0-5-1	権限のある職員	間 雄一郎